



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 JAN. 2002

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30 -  
www.inpi.fr

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **20 JUIL 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9909385**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**  
DATE DE DÉPÔT **20 JUIL. 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET HERRBURGER  
115, Boulevard Haussmann  
75008 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande  
de brevet européen

demande initiale  
☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone  
**01 44 51 68 00**

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Utilisation de bactéries propioniques pour la production d'acide propionique et/ou de  
propionates et, le cas échéant, d'acide acétique et/ou d'acétates au niveau du côlon

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

LABORATOIRES STANDA S.A.

Nationalité (s) française

Adresse (s) complète (s)

Pays

68, rue Robert Kaskoreff  
14050 CAEN CEDEX

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
(nom et qualité du signataire)

92-1114

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

990 9385

TITRE DE L'INVENTION: Utilisation de bactéries propioniques pour la production d'acide propionique et/ou de propionates et, le cas échéant, d'acide acétique et/ou d'acétates au niveau du côlon

LE(S) SOUSSIGNÉ(S) LABORATOIRES STANDA S.A.

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

ROUSSEL Edmond, Daniel: domicilié, 16, rue St Loup 14210 AVENAY (France)

LEGRAND Charles, Gabriel, domicilié: Les Ombrages N° 3 14, avenue de Creully  
14000 CAEN (France)

LEGRAND Marc, Henri, domicilié: 6, Allée Beauséjour Le Vendôme 14000 CAEN (France)

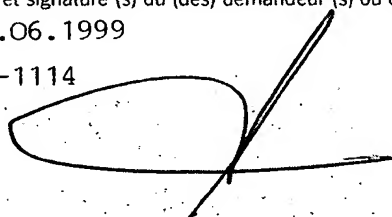
ROLAND Nathalie, domiciliée: 62, rue Papu Bâtiment A 35000 RENNES (France)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

29.06.1999

92-1114



# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

| PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS<br>OU PLANCHE(S) DE DESSIN |              |            | R.M.* | DATE<br>DE LA<br>CORRESPONDANCE | TAMPON DATEUR<br>DU<br>CORRECTEUR |
|--|--------------|------------|-------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Modifiée(s)  | Supprimée(s) | Ajoutée(s) |       |                                 |                                   |
| p 15, 18   |              |            |       | 04 .01. 00                      | 12 JAN. 2000 - V D                |
|  |              |            |       |                                 |                                   |
|  |              |            |       |                                 |                                   |
|  |              |            |       |                                 |                                   |
|  |              |            |       |                                 |                                   |
|  |              |            |       |                                 |                                   |
|  |              |            |       |                                 |                                   |
|  |              |            |       |                                 |                                   |
|  |              |            |       |                                 |                                   |

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

La présente invention se rapporte à l'utilisation de bactéries propioniques pour la production d'acide propionique et/ou de propionates et le cas échéant d'acide acétique et/ou d'acétates au niveau du côlon.

Depuis quelques années, les spécialistes nutritionnistes conseillent à leurs patients une alimentation riche en fibres auxquelles ils attribuent des effets physiologiques et métaboliques pouvant bénéficier à la santé.

Il est connu que les fibres alimentaires résistent à la digestion enzymatique dans l'intestin grêle et ne sont dégradées et assimilées qu'au niveau du côlon, c'est-à-dire de la partie terminale de l'intestin. L'effet bénéfique susmentionné ne peut donc s'exercer qu'à la condition que cette dégradation et cette assimilation soient aussi complètes que possibles à cet endroit préterminal : le colon.

Or, on a pu établir que ces réactions biologiques sont consécutives à la fermentation anaérobie des fibres alimentaires sous l'action de micro-organismes dans le côlon. Cette fermentation aboutit à la production d'acides gras volatils à chaîne courte (AGCC), d'hydrogène, de dioxyde de carbone et de biomasse.

Ces acides gras à chaîne courte sont essentiellement l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique ; dans l'organisme sain, ils ne peuvent être produits qu'au niveau du côlon, vu qu'il s'agit là du seul endroit du corps humain où règnent les conditions anaérobies strictes permettant la fermentation à la base de leur synthèse, à l'exception de l'acide acétique dont une très faible quantité peut être produite au niveau hépatique.

Or, différentes études ont prouvé l'importance de ces acides gras volatils à chaîne courte qui sont bénéfiques à la santé.

D'après la littérature, il semblerait que les rôles physiologiques de ces trois acides gras volatils à chaîne courte seraient différents les uns des autres : en effet, les acides acétiques et propioniques seraient directement conduits vers le foie où la totalité de l'acide propionique serait métabolisée alors qu'une partie de l'acide acétique

serait ensuite conduite à différents tissus, tandis que l'acide butyrique serait utilisé plus spécifiquement au niveau interne de la paroi colique.

La synthèse des acides gras à chaîne courte implique donc la présence dans le côlon, d'une part, d'un substrat à base de fibres facile à apporter par la nourriture et, d'autre part, d'une flore bactérienne équilibrée et adaptée, présente de façon optimum et constante.

Cette flore bactérienne peut provenir soit de la flore endogène persistante de chaque individu, soit de l'alimentation.

Il est, en effet, bien connu que le contenu du tube digestif humain qui est spécifique à chaque individu et correspond approximativement à 1 à 1,5 kg de matières alimentaires en cours de transformation digestive, renferme une importante population de micro-organismes constituée par un mélange de nombreuses espèces pouvant être évaluée à  $10^{11}$  à  $10^{12}$  cellules par gramme dans le côlon ; cette population constitue une masse bactérienne d'un poids certain dont l'équilibre bon ou mauvais ne peut que difficilement être modifié radicalement et surtout durablement.

Par ailleurs, l'alimentation que l'on ingère journellement n'est jamais stérile et est donc plus ou moins chargée de bactéries (lait, fromage, cidre, vin, bière, charcuterie, etc.). Les modifications de la flore colique consécutives à l'absorption de ces bactéries ne peuvent toutefois être que temporaires.

Il est, en outre, à noter qu'il a déjà été proposé de tenter de modifier la population microbienne du tractus intestinal par l'administration et en particulier l'ingestion volontaire de cellules bactériennes réputées bénéfiques à la santé (dites probiotiques) en particulier de bactéries lactiques ou de bactéries bifides.

L'introduction dans l'organisme d'une population importante de ces bactéries soit par le biais d'une alimentation particulière, soit par l'ingestion directe de ces cellules microbiennes, a plus particulièrement été proposée dans le but de limiter le développement des espèces putréfiantes :

il est en effet connu que la flore endogène présente dans le côlon est répartie en différents groupes bactériens dont certains sont inoffensifs, voire bénéfiques, tandis que d'autres, en particulier des clostridium et des putréfiants conduisent à la production de substances toxiques et influencent négativement la santé.

L'idée à la base de l'invention a consisté à introduire régulièrement dans l'organisme, par voie buccale, une quantité importante d'une flore microbienne probiotique apte à favoriser la synthèse régulière d'acides gras volatils à chaîne courte au niveau colique.

Parmi les espèces microbiennes pouvant être mises en œuvre à cet effet, les bactéries lactiques ne sont que peu adaptées puisque par leur nature, elles produisent surtout et avant tout de l'acide lactique et très secondairement un peu d'acide acétique mais pas d'acide propionique ni d'acide butyrique.

En revanche, des bactéries d'un autre type, les bactéries propioniques, sont capables de produire abondamment de l'acide propionique et de l'acide acétique donc, les deux acides gras volatils à chaîne courte qui sont appelés à irriguer les réseaux tissulaires, ce par exemple selon un pourcentage de 2/3 d'acide propionique pour 1/3 d'acide acétique. Ces bactéries sont présentes en alimentation humaine depuis des siècles, en particulier dans les fromages à pâte pressée cuite ; de plus, elles présentent l'avantage d'être mieux armées que les bactéries lactiques pour avoir une activité dans le côlon où l'anaérobiose est totale, et par ailleurs, d'être plus résistantes que les bactéries lactiques et les bactéries bifides pour traverser sans dommage la partie haute du tube digestif.

Il est à noter qu'il a déjà été proposé dans la littérature de faire absorber des bactéries propioniques, en particulier pour stimuler le développement des bactéries bifides dans l'intestin (document WO-97/19689) ou encore pour dégager du monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal (document WO-98/27991). On n'avait cependant jusqu'à présent jamais eu l'idée d'utiliser ces bactéries pour la



production d'acides gras volatils à chaîne courte au niveau du côlon.

La présente invention concerne donc l'utilisation de bactéries propioniques appartenant à des souches peu autolytiques sélectionnées en fonction de leur aptitude à résister aux sels biliaires, pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable, élaborée pour que les bactéries soient protégées au moins partiellement vis-à-vis de l'acidité gastrique, renfermant au moins  $10^6$  cellules par gramme de ces bactéries, susceptible de stimuler et d'optimiser la synthèse de quantités physiologiquement significatives d'acide propionique et/ou de propionates et, le cas échéant, d'acide acétique et/ou d'acétates au niveau du côlon par fermentation bactérienne anaérobie.

Pour que ces bactéries puissent avoir l'effet bénéfique escompté, il est indispensable de choisir des souches peu autolytiques aptes à atteindre, sans dommage, le côlon, éventuellement à s'y développer et à produire des quantités suffisantes d'acide propionique.

Il est bien connu que les deux stress principaux, auxquels les bactéries ingérées sont soumises lors de leur passage dans la partie haute du tube digestif, sont liés, d'une part, à l'acidité du milieu stomacal (pH 4 à 2) et, d'autre part, à la présence de sels biliaires dans l'intestin grêle (de l'ordre de 15 mmol/l au maximum au niveau du duodénum).

Or, on a pu établir que des bactéries ayant été exposées à l'acidité stomacale sont fragilisées et par suite inaptées à résister aux sels biliaires, ce même si elles demeurent viables à la sortie de l'estomac.

Par suite, conformément à l'invention, il est indispensable de faire subir aux bactéries propioniques un traitement de nature à leur permettre de ne pas subir le stress gastrique correspondant en règle générale à une encapsulation qui peut être volontaire ou involontaire par exemple dans le cas d'un aliment de type fromage.

Cette situation a été mise en lumière grâce à un test par lequel on a évalué l'influence du pH acide et des sels biliaires successivement ou individuellement sur la viabilité de deux souches de bactéries propioniques laitières appartenant à la collection TL du LRTL (Laboratoire de Recherches de Technologie laitière - INRA de Rennes), à savoir les souches TL 162 et TL 24 appartenant à l'espèce *P. freudenreichii subsp shermanii*.

Les résultats de ce test sont décrits ci-dessous.

Les bactéries ont été cultivées à 30°C sur milieu YEL pendant 2 jours (début de phase stationnaire). La densité optique à 650 nm était respectivement de 2,28 et 2,64 pour TL 162 et TL 24.

#### - Stress acide

Les cultures ont été diluées au 1/10<sup>ème</sup> dans du milieu S (tryptone-lactate) à pH 2,5 (pH final de 3,0). Après une incubation à 37°C pendant 45 min, les cultures ont été centrifugées et les bactéries reprises dans le même volume de YEL. Des numérations ont été faites avant et à la fin de l'incubation, et la reprise de la croissance a été suivie par des mesures de DO pendant 5 jours à 37°C.

#### - Stress biliaire

Les cultures initiales ont été centrifugées et les bactéries reprises dans un volume 10 fois supérieur de YEL contenant 0,3 % de bile de bœuf (à ~50 % de sels biliaires). Après une incubation à 37°C pendant 90 min, les cultures ont été centrifugées et les bactéries reprises dans le même volume de YEL. Des numérations ont été faites avant et à la fin de l'incubation, et la reprise de la croissance a été suivie par des mesures de DO pendant 5 jours à 37°C.

#### - Stress acide et biliaire successifs

Les bactéries ont subi un stress acide comme décrit précédemment, mais après centrifugation, les cellules ont été reprises dans du YEL contenant 0,3 % de bile. Après une deuxième incubation à 37°C pendant 90 min, les cultures ont été centrifugées et les bactéries reprises dans le même volume de YEL. Des numérations ont été faites avant et à la

Après des incubations et la reprise de la croissance a été suivie par des mesures de DO pendant 5 jours, à 37°C.

Les résultats obtenus sont rapportés, d'une part, sur le tableau 1 ci-dessous qui mentionne l'influence des stress acide et/ou biliaire sur la viabilité des bactéries et, d'autre part, sur la figure 1 qui est un schéma représentant la reprise de la croissance après les différents stress.

Tableau 1

|                      |        | Viabilité (cfu/ml) |                    |                       |
|----------------------|--------|--------------------|--------------------|-----------------------|
|                      |        | Avant stress       | Après stress acide | Après stress biliaire |
| Stress acide seul    | TL 162 | $3,0 \times 10^8$  | $9,7 \times 10^6$  | /                     |
|                      | TL 24  | $4,0 \times 10^8$  | $1,0 \times 10^7$  | /                     |
| Stress biliaire seul | TL 162 | $3,0 \times 10^8$  | /                  | $4,4 \times 10^8$     |
|                      | TL 24  | $4,0 \times 10^8$  | /                  | $4,7 \times 10^8$     |
| Stress successifs    | TL 162 | $3,0 \times 10^8$  | $9,7 \times 10^6$  | 2600                  |
|                      | TL 24  | $4,0 \times 10^8$  | $1,0 \times 10^7$  | < 10                  |

On a ainsi pu établir que :

- l'acidité entraîne une mortalité importante des bactéries (96,8 % pour TL 162 et 97,5 % pour TL 24), ce qui explique un délai assez long pour la reprise de la croissance (Figure 1).
- la bile n'entraîne aucune mortalité des bactéries, d'où une reprise très rapide de la croissance.
- lorsque l'on soumet les bactéries à la bile, après un stress acide préalable, cela conduit à une mortalité quasi totale des bactéries. Ce résultat, totalement inattendu, indique donc que des bactéries, qui ont subi un stress acide et qui toutefois restent viables, deviennent totalement sensibles à la bile alors que sans stress acide préalable, ces mêmes bactéries sont totalement résistantes aux sels biliaires.

Tenant compte de cette situation, on a effectué des essais de préadaptation dans le but d'augmenter la résis-

tance des bactéries. On sait en effet qu'un pré-stress acide (pH 4,5-5) protège efficacement les cellules contre un stress acide extrême (pH 2).

On a ainsi effectué trois essais d'adaptation sur  
5 TL 162 :

- *pré-stress acide* : incubation préliminaire des cellules à 37°C pendant 30 min à pH 5
- *pré-stress biliaire* : incubation pendant 30 min en présence de 0,08 % de bile
- 10 - *pré-stress acide et biliaire* : incubation pendant 30 min à pH 5 et en présence de 0,08 % de bile.

On a appliqué le même protocole que précédemment et obtenu les résultats rapportés dans le tableau 2 ci-dessous :

15

**Tableau 2**

|                                 | Viabilité (cfu/ml) |                         |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------|
|                                 | Avant stress       | Après stress successifs |
| Sans préadaptation              | $3 \times 10^8$    | 2600                    |
| Préadaptation acide             | $3 \times 10^8$    | 100                     |
| Préadaptation biliaire          | $3 \times 10^8$    | 1400                    |
| Préadaptation acide et biliaire | $3 \times 10^8$    | < 100                   |

On a ainsi pu établir qu'une préadaptation acide fragilise encore plus les cellules, alors qu'une pré-  
20 adaptation biliaire est sans effet.

Ces résultats ont donc permis de mettre en évidence la nécessité de traiter les stress successivement, et non pas séparément comme décrit dans la plupart des études qui ont été réalisées dans ce domaine.

25

On peut cependant supposer qu'in vivo les conditions sont moins drastiques pour les bactéries (effet tampon de l'aliment dans l'estomac, effet bactéricide moindre des sels biliaires sous forme micellaire avec les phospholipides).

Compte tenu de ce qui précède, pour augmenter la quantité de bactéries viables, une amélioration de leur résistance au pH acide n'est pas efficace puisque les bactéries restent sensibles à l'effet des sels biliaires.

5 En revanche, en protégeant les bactéries du stress acide, en particulier en les ingérant préconditionnées dans des gélules gastrorésistantes, on peut retrouver dans les fèces des bactéries naturellement résistantes à la bile, ce à un niveau élevé de viabilité.

10 Compte tenu de ces résultats, on a effectué un test complémentaire pour comparer l'aptitude de différentes souches de bactéries propioniques à produire des quantités importantes d'acide propionique après avoir été mises en contact avec des sels biliaires.

15 Dans ce test, on a comparé 33 souches de bactéries propioniques laitières appartenant à la collection TL du LRTL (INRA de Rennes) selon leur aptitude à survivre en présence de bile et à produire ensuite de l'acide propionique :

- 20 souches appartenant à l'espèce *P. freudenreichii* subsp *shermanii*
- 20 - 6 souches appartenant à l'espèce *P. freudenreichii* subsp *freudenreichii*
- 7 souches appartenant à l'espèce *P. acidipropionici*

Le protocole opérationnel a été le suivant :

25 Des cultures en début de phase stationnaire (2 à 3 jours de culture en milieu YEL incubé à 30°C) ont été diluées au 1/10<sup>ème</sup> dans du milieu YEL contenant 0,6 % de bile de bœuf (environ 7-8 mmol/l). Cette concentration en bile a été choisie de façon à discriminer au mieux les souches entre elles et constitue des teneurs en sels biliaires du même ordre

30 que celles rencontrées dans le duodénum.

Les dilutions ont été incubées à 37°C pendant 90 min, puis centrifugées. Les bactéries ont été reprises dans du milieu YEL (volume initial) et remises à incuber à 37°C.

35

Après 24 h d'incubation, la DO à 650 nm a été mesurée pour évaluer la reprise de la croissance. Le surnageant

a été récolté puis congelé pour doser les acides gras volatils.

Pour certaines souches, l'expérience a été renouvelée de façon à confirmer les résultats.

5 Les valeurs des densités optiques à 650 nm avant le stress biliaire et 24 h après la fin du stress sont rapportées dans le tableau 3 ci-dessous :

Tableau 3

| Souches :                 | DO avant le stress biliaire<br>(DO initiale/10) | DO à 24 h d'incubation après le stress biliaire | % de DO à 24 h/DO initiale |
|---------------------------|---|---|----------------------------|
| <i>P. shermanii</i>       |   |   |                            |
| TL 125                    | 0,32  | 2,02  | 63                         |
| TL 134                    | 0,29 - 0,26                                     | 2,60 - 2,04                                     | 90 - 78                    |
| TL 144                    | 0,39  | 3,62  | 93                         |
| TL 146                    | 0,27  | 1,56  | 58                         |
| TL 147                    | 0,28  | 1,23  | 44                         |
| TL 148                    | 0,23  | 0,04  | 2                          |
| TL 160                    | 0,36 - 0,32                                     | 4,67 - 4,03                                     | 130 - 126                  |
| TL 162                    | 0,26  | 1,05  | 40                         |
| TL 168                    | 0,32  | 0,57  | 18                         |
| TL 4                      | 0,32  | 0,29  | 9                          |
| TL 14                     | 0,23  | 0,73  | 32                         |
| TL 17                     | 0,29  | 0,55  | 19                         |
| TL 22                     | 0,28  | 1,39  | 50                         |
| TL 24                     | 0,28  | 1,65  | 59                         |
| TL 162                    | 0,20  | 2,08  | 104                        |
| TL 34                     | 0,26 - 0,27                                     | 3,40 - 3,87                                     | 131 - 143                  |
| TL 50                     | 0,26  | 2,05  | 79                         |
| TL 61                     | 0,23  | 1,31  | 57                         |
| TL 63                     | 0,27 - 0,26                                     | 3,26 - 3,55                                     | 121 - 137                  |
| TL 40                     | 0,30  | 1,46  | 49                         |
| <i>P. freundenreichi</i>  |   |   |                            |
| TL 142                    | 0,34 - 0,31                                     | 2,95 - 2,80                                     | 87 - 90                    |
| TL 3                      | 0,24  | 2,66  | 111                        |
| TL 19                     | 0,30  | 2,66  | 89                         |
| TL 37                     | 0,23  | 1,79  | 78                         |
| TL 33                     | 0,26  | 2,38  | 92                         |
| TL 64                     | 0,29  | 0,31  | 11                         |
| <i>P. acidipropionici</i> |   |   |                            |
| TL 2                      | 0,38  | 2,30  | 61                         |
| TL 9                      | 0,34  | 2,29  | 67                         |
| TL 15                     | 0,34  | 3,09  | 91                         |
| TL 54                     | 0,34  | 1,39  | 41                         |
| TL 47                     | 0,20  | 0,22  | 11                         |
| TL 223                    | 0,29 - 0,38                                     | 2,59 - 2,91                                     | 89 - 77                    |
| TL 249                    | 0,44  | 3,40  | 77                         |

Il est à noter que pour certaines souches, la DO finale est supérieure à la DO initiale, ce qui peut

s'expliquer par la croissance reprise à 37°C et non à 30°C comme initialement.

En fonction des résultats obtenus, on peut schématiquement distinguer trois groupes de souches :

- 5 - les souches se distinguant par une reprise rapide de la croissance, indiquant une faible mortalité des cellules due à la bile (parmi elles TL 34, TL 160, TL 63, TL 33, TL 15, TL 3, TL-162),
- des souches très peu résistantes à la bile, présentant une  
10 reprise de la croissance très faible ou nulle (TL 148, TL 4, TL 64, TL 47),
- des souches intermédiaires, caractérisées par une mortalité modérée due à la bile (TL 146, TL 147, TL 167, TL 168, TL 14, TL 17, TL 22, TL 24, TL 61, TL 40, TL 54).

15 Seules les souches possédant un ratio  $[(DO \text{ à } 24 \text{ h} / DO \text{ initiale}) \times 100]$  supérieur à 60 % (seuil choisi arbitrairement) ont été sélectionnées pour la mesure du lactate, de l'acétate et du propionate par HPLC dans les surnageants congelés. La teneur initiale du milieu YEL en lactate était  
20 de 11,4 g/l.

Les concentrations en lactate, acétate et propionate des surnageants récupérés après 24 h d'incubation, sont rassemblées dans le tableau 4 ci-dessous.



Tableau 4

| Souches :                        | Lactate<br>consommé | Acétate<br>produit | Propionate<br>produit |
|----------------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
|                                  | (en g/l)            |                    |                       |
| <b><i>P. shermanii</i></b>       |                     |                    |                       |
| TL 125                           | 5,6                 | 0,6                | 2,4                   |
| TL 134                           | 8,9 - 7,3           | 0,9 - 0,9          | 4,0 - 3,4             |
| TL 144                           | 8,8                 | 1,1                | 4,6                   |
| TL 160                           | 9,9 - 8,8           | 1,3 - 1,1          | 4,7 - 4,6             |
| TL 162                           | 5,3                 | 0,6                | 2,3                   |
| TL 34                            | 9,7 - 10,1          | 1,0 - 1,2          | 4,9 - 4,7             |
| TL 50                            | 6,6                 | 0,6                | 3,7                   |
| TL 63                            | 9,1 - 10,0          | 1,0 - 1,1          | 4,4 - 4,4             |
| <b><i>P. freundenreichi</i></b>  |                     |                    |                       |
| TL 142                           | 8,1 - 8,2           | 0,9 - 0,9          | 4,5 - 4,0             |
| TL 3                             | 7,8                 | 0,9                | 3,6                   |
| TL 19                            | 6,6                 | 0,7                | 3,7                   |
| TL 37                            | 5,5                 | 0,6                | 2,5                   |
| TL 33                            | 7,2                 | 0,8                | 3,4                   |
| <b><i>P. acidipropionici</i></b> |                     |                    |                       |
| TL 2                             | 2,7                 | 0,4                | 1,5                   |
| TL 9                             | 5,3                 | 0,6                | 2,4                   |
| TL 15                            | 3,7                 | 0,4                | 2,0                   |
| TL 223                           | 2,8 - 3,8           | 0,4 - 0,4          | 1,8 - 1,7             |
| TL 249                           | 5,2                 | 0,6                | 3,2                   |

Ce tableau montre que de manière prévisible, la quantité de propionate produit est corrélée avec le degré d'utilisation du lactate.

D'une façon générale, les souches appartenant à l'espèce *P. acidipropionici* produisent moins d'acide propionique que les souches de l'espèce *P. freundenreichii* en 24 h.

Au vu des résultats rapportés ci-dessus, certaines souches s'avèrent être de meilleurs candidats en matière de production de propionate après l'action de la bile. Il s'agit des souches produisant au moins 3 g/l de propionate dans les conditions décrites ci-dessus :

TL 134, TL 50, TL 3, TL 19, TL 33, TL 249,  
et de préférence plus de 4 g/l de propionate :  
TL 160, TL 144, TL 34, TL 63, TL 142.

Compte tenu de ce qui précède et conformément à une caractéristique préférentielle de l'invention, les bactéries propioniques utilisées sont choisies parmi les souches produisant de l'acide propionique en quantité physiologiquement significative et en particulier parmi les souches produisant au moins 3 g/l d'acide propionique et/ou de propionates et, de préférence, plus de 4 g/l d'acide propionique et/ou de propionates après avoir été cultivées à 30°C, dans du milieu YEL renfermant environ 11,4 g/l de lactate pendant 2 à 3 jours, puis diluées au 1/10<sup>ème</sup> dans un milieu YEL contenant 0,6 % de bile de bœuf, incubées à 37°C pendant 90 min, centrifugées, reprises dans du milieu YEL et remises à incuber à 37°C pendant 24 heures.

Un autre critère de sélection pouvant être pris en compte conformément à l'invention correspond aux propriétés d'adhésion des souches sur les colonocytes : des souches douées de bonnes propriétés d'adhésion présentent en effet l'avantage de demeurer plus longtemps dans le côlon, ce qui leur laisse plus de temps pour synthétiser l'acide propionique ; de plus, les souches qui se fixent, peuvent prendre la place des agents pathogènes.

Il est à noter que pour obtenir l'effet recherché, il n'est pas envisageable de faire absorber l'acide propionique lui-même vu que du fait de la chaîne métabolique humaine il ne pourrait pas parvenir au côlon et que, de plus, il a été montré qu'il est nocif à haute dose pour l'estomac.

Parmi les effets bénéfiques attribués aux acides gras volatils à chaîne courte synthétisés au niveau du côlon et en particulier à l'acide acétique et surtout à l'acide propionique, on peut noter leur rôle au niveau de l'assimilation des principaux minéraux et notamment du calcium, du fer, du zinc ou encore du magnésium ; on a en effet pu établir que l'acide propionique et, dans une moindre mesure, l'acide acétique peut favoriser l'absorption colique de ces minéraux et l'utilisation par l'organisme de la fraction absorbée.

Il s'agit là d'un effet particulièrement intéressant vu que l'assimilation des minéraux s'accompagne d'effets

fonctionnels tels qu'à titre d'exemple la correction de l'anémie pour le fer ou la minéralisation osseuse pour le calcium.

Il est à noter que, si cette action n'a pas pu jusqu'à aujourd'hui être prouvée de manière précise, les études expérimentales et cliniques, qui ont été effectuées, fournissent un faisceau d'arguments concordants à l'appui d'un effet favorable de l'acide propionique et des propionates et, dans une moindre mesure, de l'acide acétique et des acétates sur le métabolisme de ces minéraux ; cet effet est vraisemblablement plus important lorsque les conditions de digestion sont mauvaises, ce qui conduit à amener une quantité importante de minéraux non absorbés par l'intestin grêle au niveau colique, et lorsque les besoins sont élevés.

L'existence de relations entre les acides gras volatils à chaîne courte et le métabolisme des minéraux a notamment été suggérée par des études ayant utilisé des fibres solubles. On a ainsi pu établir que les polysaccharides ou oligosaccharides non digérés par les enzymes digestives et qui sont donc fermentés en acides gras volatils à chaîne courte (notamment en propionates) par la flore colique augmentent l'absorption des minéraux tels que le calcium, le fer ou le zinc et que cette augmentation est d'autant plus nette que les conditions sont pathologiques (carences, gastrectomie ...).

Des études de perfusion colique et a contrario l'absence d'effet chez des sujets côlectomisés a permis de confirmer la localisation du site d'action au niveau colique. Il a en outre été constaté que ces actions s'accompagnent d'une baisse du pH et d'une synthèse d'acides gras volatils à chaîne courte ; ceci suggère l'intervention de ces acides par le biais d'une fermentation, ce d'autant plus que l'on a vérifié que les fibres insolubles, non fermentescibles, n'ont pas d'effet. De plus, il a été établi que le cæcum est hypertrophié et que le débit sanguin colique augmente, ce qui témoigne d'un effet trophique.

Les études cliniques effectuées sur ce sujet sont peu nombreuses, mais permettent de confirmer que les effets

des fibres solubles sont obtenus par fermentation colique et de montrer directement l'effet des acides gras volatils à chaîne courte sur l'absorption des minéraux.

Parmi ces études, on peut mentionner la publication « *Trinidad TP, Wolever TMS, Thompson LU, Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. Am J Clin Nutr 1996, 63/ 574-83* » qui rend compte d'essais dans lesquels on a perfusé directement le colon distal de sujets sains avec de l'acide acétique, de l'acide propionique ou leur association à concentration physiologique ; on a ainsi établi que la disparition du calcium de la lumière colique est augmentée par les deux acides gras volatils à chaîne courte, mais de façon significativement plus importante par l'acide propionique ; cette étude a également montré un effet dose à l'appui d'un système d'absorption non saturable. Les auteurs ont suggéré que la plus grande lipophilie de l'acide propionique comparé à l'acide acétique pourrait favoriser son absorption et la libération dans le colonocyte de protons dont le passage dans la lumière digestive favoriserait l'absorption du calcium.

Compte tenu de ce qui précède, il est proposé, conformément à l'invention, d'appliquer l'utilisation susmentionnée de bactéries propioniques appartenant à des souches spécifiques sélectionnées, à l'obtention d'une composition susceptible de favoriser et d'optimiser l'assimilation des principaux minéraux en particulier du calcium et/ou du fer et/ou du zinc et/ou du magnésium.

Selon une variante de l'invention, il est également proposé d'appliquer cette utilisation à l'obtention d'une composition ayant des propriétés antifongiques (?) au niveau du côlon et, en particulier, susceptible d'y réduire le développement de mycodermes pathogènes du type candida/muguet.

Cette utilisation conduit, en fait à tirer profit des excellentes propriétés antifongiques (?) de l'acide propionique notamment pour le traitement des candidoses dues aux antibiotiques.

Il est à noter que la composition utilisée conformément à l'invention peut, le cas échéant, renfermer des bactéries autres, en particulier des bactéries lactiques et/ou des bactéries bifides susceptibles d'agir en synergie avec les bactéries propioniques de façon à augmenter les effets susmentionnés en leur fournissant du lactate en tant que substrat fermentescible.

La composition utilisée conformément à l'invention peut être constituée par une préparation sèche ou déshydratée se présentant sous forme de fractions individuelles d'environ 100 mg à 1 g, de préférence de 200 à 500 mg, renfermant de préférence au moins  $10^8$  cellules ; elle peut en particulier avantageusement se présenter sous la forme de gélules gastrorésistantes.

Selon une autre caractéristique de l'invention, cette composition peut également être constituée par une préparation élaborée, les bactéries propioniques étant ajoutées ou associées à des fibres alimentaires ou encore ajoutées ou incorporées dans des aliments fermentés liquides, pâteux ou solides.

Dans une telle préparation, les bactéries propioniques jouent un double rôle, à savoir technologique dans un premier temps à travers la fermentation d'aliments et fonctionnel dans un second temps, puisqu'une fois ingérées, elles sont capables d'atteindre le côlon et d'y jouer le rôle probiotique susmentionné, en particulier au niveau de l'optimisation de la synthèse d'acide propionique et de l'optimisation de l'assimilation des minéraux.

# REVENDEICATIONS

- 1°) Utilisation de bactéries propioniques appartenant à des souches peu autolytiques, sélectionnées en fonction de leur aptitude à résister aux sels biliaires pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable élaborée pour que les bactéries soient protégées au moins partiellement vis-à-vis de l'acidité gastrique, renfermant au moins  $10^6$  cellules/gramme de ces bactéries, susceptible de stimuler et d'optimiser la synthèse de quantités physiologiquement significatives d'acide propionique et/ou de propionates et le cas échéant d'acide acétique et/ou d'acétate au niveau du colon par fermentation bactérienne anaérobie.
- 2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les bactéries propioniques utilisées sont choisies parmi les souches produisant de l'acide propionique en quantité physiologiquement significative.
- 3°) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que les bactéries propioniques utilisées sont choisies parmi les souches produisant au moins 3 g/l d'acide propionique et/ou de propionates et, de préférence, plus de 4 g/l d'acide propionique et/ou de propionates après avoir été cultivées à 30°C, dans du milieu YEL renfermant environ 11,4 g/l de lactate pendant 2 à 3 jours, puis diluées au  $1/10^{\text{ème}}$  dans du milieu contenant 0,6 % de bile de bœuf, incubées à 37°C pendant 90 min, centrifugées, reprises dans du milieu YEL et remises à incuber à 37°C pendant 24 heures.
- 4°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour l'obtention d'une composition susceptible de favoriser l'assimilation des principaux minéraux; en particulier du calcium et/ou du fer et/ou du zinc et/ou du magnésium.

5°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour l'obtention d'une composition ayant des propriétés antifongiques au niveau du colon et, en particulier, susceptible de réduire le développement de mycodermes (?) pathogènes du type candida/muguet.

6°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les bactéries propioniques appartiennent à des souches douées de propriétés d'adhésion sur les colonocytes.

7°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la composition est constituée par une préparation sèche ou déshydratée se présentant sous forme de fractions individuelles d'environ 100 mg à 1 g de préférence de 200 à 500 mg, renfermant de préférence au moins  $10^8$  cellules.

8°) Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que la composition se présente sous la forme de gélules gastrorésistantes.

9°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la composition est constituée par une préparation élaborée, les bactéries propioniques étant ajoutées ou associées à des fibres alimentaires.

10°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la composition est constituée par une préparation élaborée, les bactéries propioniques étant ajoutées ou incorporées dans

des aliments tels que des aliments fermentés, liquides, pâteux ou solides.

- 11°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la composition renferme des bactéries lactiques et/ou des bactéries bifides.

10



des fibres solubles sont obtenus par fermentation colique et de montrer directement l'effet des acides gras volatils à chaîne courte sur l'absorption des minéraux.

Parmi ces études, on peut mentionner la publication « *Trinidad TP, Wolever TMS, Thompson LU, Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. Am J Clin Nutr 1996, 63/ 574-83* » qui rend compte d'essais dans lesquels on a perfusé directement le colon distal de sujets sains avec de l'acide acétique, de l'acide propionique ou leur association à concentration physiologique ; on a ainsi établi que la disparition du calcium de la lumière colique est augmentée par les deux acides gras volatils à chaîne courte, mais de façon significativement plus importante par l'acide propionique ; cette étude a également montré un effet dose à l'appui d'un système d'absorption non saturable. Les auteurs ont suggéré que la plus grande lipophilie de l'acide propionique comparé à l'acide acétique pourrait favoriser son absorption et la libération dans le colonocyte de protons dont le passage dans la lumière digestive favoriserait l'absorption du calcium.

Compte tenu de ce qui précède, il est proposé, conformément à l'invention, d'appliquer l'utilisation susmentionnée de bactéries propioniques appartenant à des souches spécifiques sélectionnées, à l'obtention d'une composition susceptible de favoriser et d'optimiser l'assimilation des principaux minéraux en particulier du calcium et/ou du fer et/ou du zinc et/ou du magnésium.

Selon une variante de l'invention, il est également proposé d'appliquer cette utilisation à l'obtention d'une composition ayant des propriétés antifongiques au niveau du côlon et, en particulier, susceptible d'y réduire le développement de mycodermes pathogènes du type *candida/muguet*.

Cette utilisation conduit, en fait à tirer profit des excellentes propriétés antifongiques de l'acide propionique notamment pour le traitement des candidoses dues aux antibiotiques.

5°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour l'obtention d'une composition ayant des propriétés antifongiques au niveau du colon et, en particulier, susceptible de réduire le développement de mycodermes pathogènes du type candida/muguet.

6°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5,

caractérisée en ce que

les bactéries propioniques appartiennent à des souches douées de propriétés d'adhésion sur les colonocytes.

7°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6,

caractérisée en ce que

la composition est constituée par une préparation sèche ou déshydratée se présentant sous forme de fractions individuelles d'environ 100 mg à 1 g de préférence de 200 à 500 mg, renfermant de préférence au moins  $10^8$  cellules.

8°) Utilisation selon la revendication 7,

caractérisée en ce que

la composition se présente sous la forme de gélules gastrorésistantes.

9°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8,

caractérisée en ce que

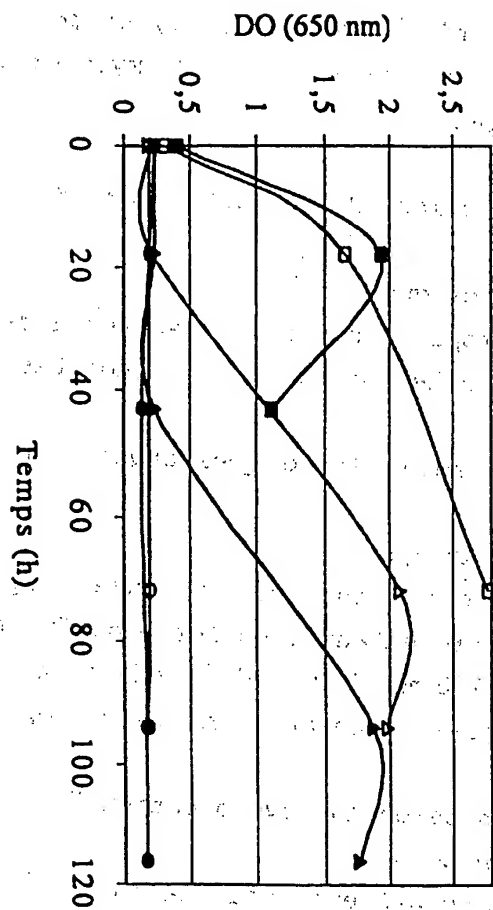
la composition est constituée par une préparation élaborée, les bactéries propioniques étant ajoutées ou associées à des fibres alimentaires.

10°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8,

caractérisée en ce que

la composition est constituée par une préparation élaborée, les bactéries propioniques étant ajoutées ou incorporées dans

Figure 1



- Δ— TL 162 après stress acide
- ◻— TL 162 après stress biliaire
- TL 162 après stress successifs
- ▲— TL 24 après stress acide
- ◼— TL 24 après stress biliaire
- TL 24 après stress successifs

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**